

PCT

国際争紛同
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



BA

(51) 国際特許分類6 C12Q 3/00, C07K 14/47, C12Q 1/02		A1	(11) 国際公開番号 WO00/18970
			(43) 国際公開日 2000年4月6日(06.04.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05302	(22) 国際出願日 1999年9月28日(28.09.99)	(30) 優先権データ 特願平10/274574 1998年9月29日(29.09.98) JP	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒530-8205 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP)	(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 瀬戸 実(SETO, Minoru)[JP/JP] 〒417-0855 静岡県富士市三ツ沢572-33 Sizuoka, (JP) 福田耕一郎(FUKUDA, Kouichirou)[JP/JP] 〒416-0908 静岡県富士市柚木282-1 Sizuoka, (JP)	(74) 代理人 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)	

(54)Title: **METHOD FOR CONTROLLING THE RELEASE OF GRANULES**

(54)発明の名称 顆粒放出のコントロール方法

(57) Abstract

A method for controlling the release of granules by treating a cell system capable of releasing granules so as to increase or decrease activated calgranulin to thereby enhance or depress the release of granules. A method for detecting a substance capable of activating or inhibiting the capability of releasing granules by using the above method. Activated calgranulin is increased by making the cells highly permeable and introducing calgranulin and soluble calcium thereinto. Activated calgranulin is decreased by introducing a calgranulin antibody into the cells. These methods are useful in screening a substance capable of activating or inhibiting the release of granules.

(57)要約

顆粒放出能を有する細胞系に、活性型カルグラニュリンを増加または減少せしめる処理をすることによって顆粒放出を増加または減少せしめる顆粒放出のコントロール方法。

この方法を利用して顆粒放出能を活性化または阻害する物質を検出する方法。

活性型カルグラニュリンの増加は、細胞を高透過性とし、カルグラニュリンと可溶性カルシウムを添加導入することによって行なわれる。減少は、カルグラニユリン抗体を細胞内に添加導入することにより行なわれる。

顆粒放出を活性化または阻害する物質をスクリーニングするのに有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SDE スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロ伐キア
BA ポズニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GDE グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジ蘭
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴー
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM ツルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダッド・トバゴ
CG コンゴー	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IN インド	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IS アイスランド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IT イタリア	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	JP 日本	NL オランダ	YU ヨーロッパ
CU キューバ	KE ケニア	NO ノールウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KG キルギスタン	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KP 北朝鮮	PL ポーランド	
DE ドイツ	KR 韓国	PT ポルトガル	
DK デンマーク		RO ルーマニア	

明細書

顆粒放出のコントロール方法

技術分野

本発明は、顆粒放出能を有する細胞系、好ましくは好中球の顆粒放出をコントロールする方法及びそれに基づいた顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する物質の検出方法に関する。

従来技術

好中球は、生体制御において重要な役割を果たしている。好中球の主な機能は、生体に進入した細菌・微生物に向かって遊走し、これら侵入物を貧食した後、殺菌することである。好中球の殺菌機構の一つは、食胞が顆粒と融合した後、顆粒内に存在する殺菌性蛋白質や蛋白分解酵素が作用して殺菌を行うことである。好中球内に存在する殺菌性蛋白質や蛋白分解酵素は重要な殺菌物質であるが、時としてその過剰産生・過剰放出が血管内膜を障害することが知られている(Fahey, T. J. ら、In Update Pulmonary Diseases and Disorders(Fishman AP, ed) (1992) MacGraw-Hill, New York)。

血管内膜障害は成人呼吸窮迫症候群 (ARDS)(Weiland, J. E. ら、Am. Rev. Respir. Dis. (1986)133:218-225)、虚血後再灌流障害(Cavanagh, S. P. ら、Cardiovasc. Surg. (1998)6:112-118)、糸球体腎症(Jennette, J. C. and Falk, R. J.、Am. J. Kidney Dis. (1994)24:130-141)、のう胞性線維症(Greenberger, P. A.、J. A. M. A(1997)278:1924-1930)、リューマチ性関節炎(Chang, D. J. ら、Semin. Arthritis Rheum. (1996)25:390-403)、慢性気管支炎(Hoidal, J. R.、Semin. Respir. Infect. (1994)9:8-12)、血管レン縮(Merhi, Y. ら、Arterioscler. Thromb. (1993)13:951-957)、喘息(Borson, D. B. ら、Am. J. Physiol. (1991)260:L212-L225)、末梢循環障害、狭心症(Merhi, Y. ら、Arterioscler. Thromb. (1993)13:951-957)、高血圧症(Dzau

, V. J., Am. J. Med. (1984)77:31-36)、動脈硬化(Belch, J. J., Curr. Opin. Lipidol. (1994)5:440-446)等の疾患の発症に深く関与している。したがって好中球の顆粒放出を阻害する物質は好中球顆粒放出の関与するこれらの疾患に対する治療薬になりうるものと考えられる。また好中球顆粒放出を抑制する遺伝子は好中球顆粒放出の関与するこれらの疾患に対する遺伝子治療を可能にすると考えられる。

しかし、現在、好中球の顆粒放出機構はほとんど不明である。好中球内のカルシウム濃度が上昇することが、顆粒放出には必須であることが知られているが、このカルシウム濃度上昇によって活性化され顆粒放出を惹起する分子は知られていない。よって今まで、特異的な好中球放出阻害剤の開発および好中球放出阻害をターゲットとした遺伝子治療は実施されていない。

しかし、このカルシウム濃度上昇によって活性化される好中球内分子を特定し、その分子を阻害する化合物および遺伝子を探索することにより、これらが、上記好中球顆粒放出の関与する疾患や現象、たとえば、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、急性心筋梗塞時の虚血後再灌流障害、糸球体腎症、のう胞性線維症、リューマチ性関節炎、慢性気管支炎、脳血管レン縮、喘息、末梢循環障害、狭心症、高血圧症、動脈硬化等に有効な予防および／または治療薬剤、治療法となると期待される。

カルグラニュリンにはカルグラニュリンA(calgranulinA)(Burmeister, G., Immunology(1986)171:461-474)(S100A8, MRP8、p8、またはL1軽鎖等命名されている)、カルグラニュリンB(calgranulinB)(Burmeister, G., Immunology(1986)171:461-474)(S100A9, MRP14、14またはL1重鎖等命名されている)およびカルグラニュリンC(calgranulinC)(Dell'Angelica, E. C., J. Biol. Chem. (1994)269:28929-28936)(S100A12またはp6等と命名されている)の3種類が存在する。

カルグラニュリンAは分子量約8kDのカルシウム結合蛋白質であり、カルグラ

ニュリンBはおよそ分子量約14kDのカルシウム結合蛋白質であり、カルグラニュリンCは分子量約10kDのカルシウム結合蛋白質であり、S100蛋白質に分類される。

カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBは1988年に E. Lagasse らによってクローニングされ、その全アミノ酸配列が報告されている (E. Lagasse and R. G. Clerc, Mol. Cellular. Biol. (1988)8: 2402-2410)。カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBは好中球および単球に特異的に存在し、好中球または単球に含まれる全蛋白質含量の約5%を占める。

カルグラニュリンの細胞内での生理機能を示唆する知見として、カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBが in vitro でカゼインキナーゼIおよびIIの活性を阻害すること (Murao, S. ら、J. Biol. Chem. (1989)264:8356-8360) が報告されている。

しかしながら、カゼインキナーゼIおよびIIの好中球および単球における生理的機能は現在のところ不明である。またこの阻害作用はカルシウム濃度に依存しない。よってカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBのカゼインキナーゼIおよびIIの活性制御を介した生理的意義は不明である。カルグラニュリンの細胞外での生理機能を示唆する知見として、カルグラニュリンAが好中球および単球の遊走活性を上昇させること (Geczy, C. L., Biochim. Biophys. Acta (1996)1313:246-253)、カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBが抗菌活性を示すことなどが報告されている (Murthy, A. R. K. ら、J. Immunol. (1993)151:6291-6301)。

しかしながら好中球および単球の遊走活性を有するカルグラニュリンはマウスのカルグラニュリンAのみであり、ヒトを含む他の温血動物に普遍的な生理機能ではない。カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの抗菌活性はカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBが菌の生育に必要な溶液中の2価金属をトラップするためと考えられ、カルグラニュリンに特異的な生理機能とは考えにく

い。

カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの生理的な機能はほとんどわかっていないのが現状であり、カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBが好中球または単球の顆粒放出機構をコントロールすることは全く知られていない。カルグラニュリンCは1997年にJ. D. Gottsch らによりクローニングされ、その全アミノ酸配列が報告されている(Gottsch, J. D. ら、Trans. Am. Ophthalmol. Soc. (1997)95:111-125)。カルグラニュリンCは顆粒球に含まれることが知られているが、他の細胞での局在は不明である。またその機能も不明である。よってカルグラニュリンCが好中球または単球の顆粒放出機構をコントロールすることは全く知られていない。

発明の開示

本発明は、顆粒放出能を有する細胞系の顆粒放出をコントロールする方法およびそれに基づいた顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する物質を検出する方法を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、顆粒放出能を有する細胞系の活性型カルグラニュリンを増加せしめる処理をなすと、該細胞系が顆粒放出し、また活性型カルグラニュリンを減少せしめる処理をなすと該細胞系の顆粒放出が減少し、それによって顆粒放出反応をコントロールできることを見出し本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、顆粒放出能を有する細胞系に、活性型カルグラニュリンを増加または減少せしめる処理をなすことにより、該細胞系の顆粒放出を増加または減少せしめることよりなる顆粒放出のコントロール方法である。

ここで顆粒放出能を有する細胞系とは、顆粒放出能を有する細胞系であれば特に限定されないが、例えば、温血動物由来の好中球または好中球様の培養細胞が

好みしい例として挙げられる。温血動物由来の好中球は中好性白血球、中性好性白血球、異好性白血球または多形核白血球とも呼ばれる好中球様の培養細胞とは、好中球に含まれる顆粒を少なくとも1種類以上有する培養細胞であり、具体的には例えば、レチノイン酸、ジメチルスルホキシドなどによる適宜処理により顆粒球に分化誘導可能なHL60細胞などが例示される。好中球は温血動物の血液もしくはカゼイン腹腔内投与などの刺激により腹腔内に移行してくる細胞から分離調製される（続生化学実験講座8血液・下、第679-685頁）。顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株は適当な分化誘導剤にて好中球様細胞に分化誘導して使用する（続生化学実験講座8血液・上、第117-123頁）。

カルグラニュリンは、例えば、温血動物に存在し、カルグラニュリンA(S100A8、MRP8、p8または、L1軽鎖等命名されている)またはカルグラニュリンB(S100A9、MRP14、p14または、L1重鎖等命名されている)が知られている。ヒト型のカルグラニュリンAおよびヒト型のカルグラニュリンBはクローニングされ、その全アミノ酸配列が報告されている(E. Lagasse and R. G. Clerc、Mol. Cellular. Biol. (1988)8:2402-2410)。またマウス型のカルグラニュリンAおよびマウス型のカルグラニュリンBはクローニングされ、その全アミノ酸配列が報告されている(E. Lagasse and I. L. Weissman、Blood(1992)79:1907-1915)。マウス型のカルグラニュリンAおよびマウス型のカルグラニュリンBはヒト型のカルグラニュリンAおよびヒト型のカルグラニュリンBに対しそれぞれ約60%と高いアミノ酸配列の相同性を示す。温血動物に存在するカルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBはそれぞれ、動物種差によるアミノ酸配列の違いが比較的少ないと考えられる。すなわち、本発明のカルグラニュリンとしては、ヒトカルグラニュリンA又はBのアミノ酸配列に対して、約60%以上の相同性を示すアミノ酸配列も、以下の好みしい活性を有すれば好みしいペプチドの例に包含される。

本発明では、カルグラニュリンが、活性を有する場合を特に活性型カルグラニュリンと呼ぶ。具体的には、カルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBに基づく活性であれば良く、次のカルグラニュリン活性の確認・測定法にて、簡単に確認可能である。

すなわち、カルグラニュリン活性は実施例1または2に示した方法を使用し簡単に確認・測定することができる。実施例1の方法によって作製した高透過性好中球浮遊液を96穴イムノプレートに分注し、30-40 °Cで5-30分間インキュベーションする。水可溶性カルシウム化合物とカルグラニュリン活性を有する物質を同時または順次添加し、上清に放出される物質、例えばエラスターーゼまたはラクトフェリンの量を実施例1または2の方法によって測定することにより、カルグラニュリンの活性を確認測定する。

活性型カルグラニュリンは、通常の場合、カルグラニュリンとカルシウムとが結合することにより活性型カルグラニュリンとなる。

また、カルグラニュリンの同属体またはカルグラニュリン混合物も本発明におけるカルグラニュリンのなかに包含される。

カルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBの同属体とは、カルグラニュリン活性を有するそれらの変異体、断片および誘導体である。変異体とはDNAのレベルにおいて自然にまたは人為的な遺伝子操作、例えば部位特異的突然変異誘発により形成される同様の活性を有する、一部アミノ酸の置換、欠失または付加(PAS, 75, pp4268-4270(1978)、Nucleic Acid Res., 6, pp2973-2985(1979)、Genetic Engineering-Principle and Methods-Vol. 3, pp1-32(1981)等)されたカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBである。

断片とは連続するアミノ酸を含んでなるカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの断片である。

誘導体とは例えば、官能基、例えばアミノ、ヒドロキシ、メルカプト又はカルボキシ基が誘導体化、例えばグルコシル化、アシル化、アミド化又はエステル化されているものである。さらに、誘導体とはカルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBの二量体、その変異体またはその断片であって、システイン残基のメルカプト基が酸化された形態のジスフィルド形であって分子間S-S結合を提供しているもの、ならびにカルグラニュリンAまたはその変異体もしくはその断片とカルグラニュリンBまたはその変異体もしくはその断片との混合二量体であってシステイン残基の酸化されたメルカプト基を介して結合しているものであって、カルグラニュリン活性を有するものであればなんら限定されない。

混合物は、カルグラニュリンAまたはその同属体とカルグラニュリンBまたはその同属体を任意の割合で混合したものであって、カルグラニュリン活性を有するものであればなんら限定されない。

カルグラニュリンAのアミノ酸配列を配列表配列番号1 (Nature(1987)330(5)80-82)に、またカルグラニュリンBのアミノ酸配列を配列表配列番号2 (同誌)にそれぞれ示す。従って、本発明における活性型カルグラニュリンとしては、
(i) 配列表配列番号1の1-93のアミノ酸配列からなり、且つカルシウムが結合しているペプチド、
(ii) 配列表配列番号2の1-114のアミノ酸配列からなり、且つカルシウムが結合しているペプチド、
(iii) 配列表配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が置換、欠損または付加されたアミノ酸配列からなり、カルシウムが結合しており、かつ顆粒放出能を有する細胞系の顆粒放出を増加せしめる活性を有するペプチド
のいずれか1種以上であることが好ましい例として挙げられる。

本発明において、顆粒放出能を有する細胞系の活性型カルグラニュリンを増加せしめる方法としては、以下の方法が例示される。

- a) 顆粒放出能を有する細胞系、特に好ましくは好中球または好中球様の培養細胞の細胞膜を、高透過性細胞膜に変化させ、カルグラニュリンおよび水可溶性カルシウム化合物を、同時または順次添加する方法。
- b) 顆粒放出能を有する細胞系に、極細の注射針により、カルグラニュリンおよび水可溶性カルシウム化合物を、同時または順次マイクロインジェクションする方法。
- c) カルグラニュリンを水可溶性カルシウム化合物と混合した後リポソームに封入し、顆粒放出能を有する細胞系に接触せしめ、膜融合する方法。
- d) カルグラニュリン遺伝子を、顆粒放出能を有する細胞系へ導入しカルグラニュリンを強発現させ、これに水可溶性カルシウム化合物を導入する方法。

顆粒放出能を有する細胞系を、高透過性細胞膜となすには、例えば、まず血液中の顆粒放出能を有する細胞を分離調製する。この分離調製は従来知られているどのような方法で行なってもよい。顆粒放出能を有する細胞系には、浮遊性がある場合と、場合によっては付着性細胞がある場合とがある。本発明においては浮遊性細胞が血液から分離しやすいので好ましい。血液より分離された顆粒放出能を有する細胞を、生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水に懸濁して保存する。そして使用時に、塩化カリウム及び塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えば HEPES 緩衝液、Tris緩衝液に再懸濁し、インキュベーションし、これに高透過性細胞膜とする処理を行なうとよい。本発明で使用する塩化カリウム及び塩化ナトリウムを含む緩衝液としては、50~200mM 塩化カリウム及び5-30mM塩化ナトリウムを含む緩衝液、例えば 10-50mM HEPES (pH6.5-7.5) または 10-50mM Tris(pH6.5-7.5) 緩衝液が好ましく、またインキュベーションは、4-40°Cで10-60 分間行なうこと

が好ましい。

また、血液より分離された顆粒放出能を有する細胞は牛胎児血清を含む RPMI 1640培地またはMEM 培地などで培養し、浮遊細胞の場合は、前記塩化カリウム及び塩化ナトリウムを含む緩衝液に再懸濁し、付着細胞の場合は、上清の培地を廃棄し、前記塩化カリウム及び塩化ナトリウムを含む緩衝液に再懸濁し、前記と同様にインキュベーションし、これに高透過性細胞膜とする処理を行なうとよい。

このようにして処理した顆粒放出能を有する細胞系を高透過性細胞膜とする処理を行なう。この処理法は、例えば、この細胞系を、界面活性剤、菌体由来毒素、またはグリセリンなどのような細胞膜の一部に作用して膜に穴を開ける作用を有する薬剤にて、処理する方法が挙げられる。界面活性剤としては、例えばジギトニン、サポニン、Octylphenol-polyethyleneglycoether(トリトン X-100)、3-[$(3\text{-cholamidopropyl})\text{dimethylammonio}$]-1-propane-sulfonate(CHAPS)、poly oxyethylene(20)cetyl ether(Brij58) などが挙げられる。また、菌体由来毒素としては、例えば α -トキシン、ストレプトリジン-0 などが挙げられる。細胞系 1×10^7 個/ml 当たり、上記薬剤 $0.01 \mu\text{M}$ - 1000mM を加え、 4°C - 40°C で 5-120 分間処理することが好ましい。

また高透過性細胞膜となす他の方法としては、細胞を短い電気パルス(エレクトロポレーション法)にて処理することも好ましい。具体的には、細胞系 1×10^7 個/ml 当たり電気パルス $1\text{-}10\text{KV}$ 、 4°C - 40°C で 1-30 分間処理することが好ましい。

さらに、高透過性細胞膜となす他の方法として、レーザービームによる方法、低張溶液による方法なども好ましい。

本発明で使用する水可溶性カルシウム化合物は、水と接触したときに、カルシウムイオンを生ずるものであれば特に限定されないが、例えば酢酸カルシウム、

炭酸カルシウム、塩化カルシウムなどの粉末、水溶液などが例示される。特に、水可溶性カルシウム化合物が、水と接触したときに、100mM 以上のカルシウムイオンを生ずるものであることが好ましい。水溶液である場合には、100mM 以上のカルシウムイオンを含有する水溶液が好ましい。

本発明で高透過性細胞膜に、カルグラニュリンと水可溶性カルシウム化合物とを同時に添加するとは、カルグラニュリンと水可溶性カルシウム化合物をあらかじめ混合し、インキュベーションして、活性型カルグラニュリンとし、これを添加することであり、カルグラニュリンと水可溶性カルシウム化合物を順次添加するとは、カルグラニュリンと水可溶性カルシウム化合物とをそれぞれ個々に添加することであり、添加順序はいずれが先でもよい。

カルグラニュリンの添加量は通常0.01 μ M 以上好ましくは 0.1 μ M ~ 5 μ M、上限としては特に限定されないが、10 μ M 以下が好ましい。また水溶性カルシウム化合物の添加量についても同様に通常0.01 μ M 以上、好ましくは 0.1 μ M ~ 5 μ M、上限としては特に限定されないが10 μ M 以下が好ましい。

インキュベーション濃度は、通常 4 ~ 40°Cで行われる。インキュベーション時間は通常 5 ~ 30 分で行われる。

次に、顆粒放出能を有する細胞系の活性型カルグラニュリンを増加せしめるその他の方法について説明する。

まず、顆粒放出能を有する細胞を血液より分離調製し、前記と同様に生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水に懸濁して保存して使用する。あるいは牛胎児血清を含むRPMI培地またはMEM 培地などに培養し、浮遊細胞の場合は培養培地に懸濁し、付着細胞の場合は培養培地の存在下に、マイクロインジェクションし、リポソーム導入、遺伝子導入等に使用する。

マイクロインジェクションは通常行なわれている方法によって実施されるが、

マイクロインジェクションに使用する極細の注射針は、通常、径 $1 \mu\text{m}$ 以下、好ましくは径 $0.1\text{--}0.8 \mu\text{m}$ の注射針を用いることが好ましい。このような注射針は、ガラスキャピラリーを熔融引き延ばして作製することができる。具体的には、 $1 \mu\text{m}$ 以内で制動可能なマニュピレーターに注射針をセットしインジェクターにて加圧しながら、細胞系に、カルグラニュリンと可溶性カルシウム化合物とを同時にマイクロインジェクションするかあるいはカルグラニュリンをマイクロインジェクションした後、しばらくして、例えば1-60分後、好ましくは3-10分後に、水可溶性カルシウム化合物をマイクロインジェクションする。また、水可溶性カルシウム化合物をマイクロインジェクションした後、カルグラニュリンをマイクロインジェクションしてもよい。この場合のカルグラニュリン及び水可溶性カルシウム化合物の濃度は上記と同程度が望ましい。

リポソームにより膜融合させて活性型カルグラニュリンを顆粒放出能を有する細胞系に増加させる方法においては、カルグラニュリンを水可溶性カルシウム化合物と混合した後リポソームに封入し、顆粒放出能を有する細胞系に接触せしめ、膜融合させる。まず、コレステロールを含むリン脂質溶液、例えば卵黄フォスファチジルコリン、ジミリストイルフォスファチジン酸、コレステロールをモル比4:1:5になるようにして混合液を調製する。これに水可溶性カルシウム化合物とカルグラニュリンを添加し、攪拌し、メンブランフィルター、例えばテフロン製メンブランフィルターで濾過してエマルジョンを作製する。このエマルジョンをロータリーエバボレーターにかけて有機溶媒を除去し、リポソームに封入されなかったカルグラニュリンを除去する。この除去手段としては、12%ショ糖密度勾配遠心分離を用いることが望ましい。このようにしてカルグラニュリンを水可溶性カルシウム化合物と混合して活性型カルグラニュリンとし、これを封入したりポソームを調製する。次に、この活性型カルグラニュリンを封入したりポソーム

を、前記した顆粒放出能を有する細胞と接触させる。例えば、細胞 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個当たり、リポソームを $0.01\text{-}100 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\text{-}10 \mu\text{M}$ の濃度で添加し、インキュベーションする。このインキュベーションは、例えば $4\text{-}40^\circ\text{C}$ で $1\text{-}30$ 分間行なわれる。このようにすると膜融合が行なわれ、顆粒放出能を有する細胞系に活性型カルグラニュリンを増加させることができる。

カルグラニュリンを強発現させる方法としては、カルグラニュリンをコードする遺伝子を、公知のプラスミドベクターまたはウイルスベクターに組み換え、細胞系に導入することによって行なうことができる。カルグラニュリンをコードする遺伝子は、例えば、配列表配列番号 1 または 2 に記載の塩基配列を使用することができる。組み換え体ベクターはリン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン法、電気パルス法などにより細胞系に導入することができる。細胞系にカルグラニュリン遺伝子を導入してカルグラニュリンを強発現させるに際しては、好ましくは、前記のような各種の手法により、又は、遺伝子を導入する際に、前述の高透過性細胞膜を有する細胞となし、水可溶性カルシウム化合物を細胞系に導入することが好ましい。具体的には、例えば、細胞系 $0.5\text{-}3 \times 10^7$ 個あたり $1\text{-}200 \mu\text{g}$ のカルグラニュリン遺伝子を組み込んだプラスミドベクターまたはウイルスベクターを $1\text{-}100 \mu\text{g}$ のリン酸カルシウムまたは $0.1\text{-}10\text{mg}$ のDEAEデキストランまたは $1\text{-}100 \mu\text{g}$ のリポフェクチンと $4\text{-}40^\circ\text{C}$ で $5\text{-}120$ 分間、インキュベーションすることにより、または細胞 $0.5\text{-}3 \times 10^7$ 個あたり $1\text{-}200 \mu\text{g}$ のカルグラニュリン遺伝子を組み込んだプラスミドベクターまたはウイルスベクターを添加し $0.05\text{-}0.5\text{kV}$ の短い電気パルスにより $4\text{-}40^\circ\text{C}$ で $1\text{-}30$ 分間処理することにより、カルグラニュリン遺伝子が細胞に導入される。水可溶性カルシウムの導入は、前記したような種々の方法が用いられる。

本発明の顆粒放出能を有する細胞系の活性型カルグラニュリンを減少せしめる

方法としては、次の方法が例示される。

- a) 顆粒放出能を有する細胞系を、高透過性細胞膜に変化させ、カルグラニュリン抗体を添加する方法、
- b) 顆粒放出能を有する細胞系に、極細の注射針にてカルグラニュリン抗体をマイクロインジェクションする方法、
- c) カルグラニュリン抗体をリポソームに封入し、顆粒放出能を有する細胞系に作用させ、膜融合させる方法、
- d) カルグラニュリン遺伝子に対するアンチセンス遺伝子を顆粒放出能を有する細胞系へ導入してカルグラニュリンをノックアウトする方法。

カルグラニュリンに対するモノクロナール抗体は、Am. J. Physiol. 274, C1563-C1572(1988) に記載されている方法により作成できる。例えば、カルグラニュリン $10\text{--}100\mu\text{g}$ をフロインドのコンプリートアジュバンドと混合しマウス腹腔内に投与する。2週間おきに数回投与した後、脾臓を摘出し、脾細胞を調製する。ポリエチレングリコールを使用し、ミエローマ細胞と融合させ、15%牛胎児血清を含むHAT 培地にて培養し融合細胞のみを選択する。コロニーが肉眼で確認できるようになった時点で、カルグラニュリンを96穴イムノプレートに結合させた ELISA法にてカルグラニュリン抗体産生細胞を確認し、限界希釀法にてクローニングする。得られた細胞を培養し、培養上清に産生するカルグラニュリンに対するモノクロナール抗体を取得する。

またカルグラニュリンに対するモノクロナール抗体は、BMA 社より入手できる。カルグラニュリンに対するポリクロナール抗体を得るには、カルグラニュリン $10\text{--}100\mu\text{g}$ をフロインドのコンプリートアジュバンドと混合しウサギ皮下に投与する。2週間おきに数回投与した後、採血し抗血清としてポリクローナル抗体を得る。

カルグラニュリン抗体は、前述の方法により作成した高透過性細胞膜を有する顆粒放出能を有する細胞系に、例えば該細胞 1×10^5 - 1×10^7 個当たり、カルグラニュリン抗体を $1\text{-}100 \mu\text{g}$ 添加し、 $4\text{-}40^\circ\text{C}$ で1-30分間処理することにより、細胞に導入される。

また、カルグラニュリン抗体は、マニュピレーターに注射針をセットしインジェクターにて加圧しながら、 $0.01\text{-}10 \mu\text{g}$ のカルグラニュリン抗体を細胞系にマイクロインジェクションすることにより、細胞系に導入される。

さらに、カルグラニュリン抗体は、前述したリポソームに $1\text{-}100 \mu\text{g}$ の濃度のカルグラニュリン抗体を封入し、細胞 1×10^5 - 1×10^7 個当たり $0.01\text{-}100 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\text{-}10 \mu\text{M}$ の濃度で添加し、例えば $4\text{-}40^\circ\text{C}$ で1-30分間インキュベーションすることにより、細胞に導入される。

また、カルグラニュリンアンチセンス遺伝子は、例えば配列表配列番号1または2に示した塩基配列と相補的な塩基配列を持つ遺伝子を組み込んで得ることができる。本発明では、このカルグラニュリンアンチセンス遺伝子を、細胞系 $0.5\text{-}3 \times 10^7$ 個あたり $1\text{-}200 \mu\text{g}$ 組み込んでプラスミドベクターまたはウイルスベクターを調製する。得られたベクターを $1\text{-}100 \mu\text{g}$ のリン酸カルシウムまたは $0.1\text{-}10\text{mg}$ のDEAEデキストランまたは $1\text{-}100 \mu\text{g}$ のリポフェクチンと $4\text{-}40^\circ\text{C}$ で 5-120分間インキュベーションする。または細胞 $0.5\text{-}3 \times 10^7$ 個あたり $1\text{-}200 \mu\text{g}$ のカルグラニュリンアンチセンス遺伝子を組み込んだプラスミドベクターまたはウイルスベクターを添加し $0.05\text{-}0.5\text{kV}$ の短い電気パルスにより $4\text{-}40^\circ\text{C}$ で1-30分間処理する。

このようにしてカルグラニュリン遺伝子に対するアンチセンス遺伝子を顆粒放出能を有する細胞に導入してカルグラニュリンをノックアウトする。

以上の手法により、顆粒放出能を有する細胞系に、活性型カルグラニュリンを

増加または減少せしめる処理をなすことができる。その結果、該細胞系の顆粒放出を増加または減少せしめることによって該細胞系における顆粒放出のコントロールが達成可能である。

好中球の顆粒放出は前記のように血管内膜を障害する。血管内膜障害は成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、急性心筋梗塞時の虚血後再灌流障害、糸球体腎症、のう胞性線維症、リューマチ性関節炎、慢性気管支炎、脳血管レン縮、喘息、末梢循環障害、狭心症、高血圧症、動脈硬化等の疾患に深く関与している。従って、上記の顆粒放出のコントロール方法において、特に、顆粒放出を減少せしめる場合には、上述の疾患の治療剤、改善剤、またはその改善方法となる。特に、患者より取り出した好中球にカルグラニュリンに対するアンチセンス遺伝子をウイルスベクターに組み替え遺伝子導入し、患者に戻すことにより、好中球顆粒放出の関与する疾患や現象、たとえば、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、急性心筋梗塞虚血後再灌流障害、糸球体腎症、のう胞性線維症、リューマチ性関節炎、慢性気管支炎、脳血管レン縮、喘息、末梢循環障害、狭心症、高血圧症、動脈硬化に対する遺伝子治療を可能にすると考えられる。すなわち、上記の顆粒放出のコントロール方法には、上述の疾患の治疗方法、改善方法が含まれる。

また、本発明は、顆粒放出反応を阻害または活性化する物質を検出する方法である。

すなわち、本発明は次の工程を含む顆粒放出反応を阻害または活性化する物質の検出方法である。

- A) 顆粒放出能を有する細胞系の活性型カルグラニュリンを増加せしめる工程；
- B) 顆粒放出反応を阻害または活性化する物質を含有することが疑われる検体（以下、検体ということがある）と、顆粒放出能を有する細胞系とを接触せしめ、インキュベーションする工程；

C) 該細胞系から放出された検出対象物質を検出する工程：

本発明における工程B)の検体と顆粒放出能を有する細胞系との接触は工程A)の活性型カルグラニュリンを増加せしめる工程の前または後あるいはこの工程中に行なってもよい。

本発明の前記顆粒放出反応を阻害または活性化する物質の検出方法には、顆粒放出反応を阻害または活性化する物質の検出定量あるいは該物質のスクリーニング方法も含まれる。

本発明の前記A)の顆粒放出能を有する細胞系の活性型カルグラニュリンを増加せしめる工程については前述と同様に行なうことができる。すなわち、

a) 顆粒放出能を有する細胞系、特に好ましくは好中球または好中球様の培養細胞の細胞膜を、高透過性細胞膜に変化させ、カルグラニュリンおよび水可溶性カルシウム化合物を、同時または順次添加する方法。

b) 顆粒放出能を有する細胞系に、極細の注射針により、カルグラニュリンおよび水可溶性カルシウム化合物を、同時または順次マイクロインジェクションする方法。

c) カルグラニュリンを水可溶性カルシウム化合物と混合した後リポソームに封入し、顆粒放出能を有する細胞系に接触せしめ、膜融合させる方法。

d) カルグラニュリン遺伝子を、顆粒放出能を有する細胞系へ導入しカルグラニュリンを強発現させ、これに水可溶性カルシウム化合物を導入させる方法等を挙げることができる。

本発明の前記B)の顆粒放出反応を阻害または活性化する物質を含有することが疑われる検体と、顆粒放出能を有する細胞系とを接触せしめ、インキュベーションする工程については、まず前記検体としては生体成分、天然物あるいは化合物等を例示することができる。そして、検体と顆粒放出能を有する細胞系との接触

は、工程A)の活性型カルグラニュリンを増加せしめる工程の前または後あるいはこの工程中に行なわれる。従って、顆粒放出能を有する細胞系は、前記顆粒放出能を有する細胞系自体、カルグラニュリンを増加させた細胞系あるいは活性型カルグラニュリンを増加させた細胞系などが用いられる。これらのうち前2者の細胞系は前記活性型カルグラニュリン増加処理をすることによって活性型カルグラニュリンを増加させる。

好ましい活性型カルグラニュリンの増加方法は、まず顆粒放出能を有する細胞系のカルグラニュリンを増加させ、その後この細胞系の水可溶性カルシウム化合物を増加させるか、あるいは顆粒放出能を有する細胞系に、カルグラニュリンと水可溶性カルシウム化合物とを反応させた活性型カルグラニュリンを増加させることが望ましい。そして検体は、このカルグラニュリンあるいは活性型カルグラニュリンの増加の前後または増加処理中に該細胞系に添加して該細胞系と接触させる。検体は積極的に細胞膜を貫通させる処置を行わず、該細胞系と接触させる方が、医薬品のスクリーニング法としては好ましい。

この例を挙げると次のとおりである；まず、高透過性細胞膜を有する細胞系を用いる場合は、該細胞の懸濁液に適当な濃度の顆粒放出反応を阻害または活性化する物質を含有することが疑われる検体を添加してインキュベーションする。この場合、高透過性細胞膜を有する細胞として高透過性細胞膜を有する好中球懸濁液または好中球様の培養細胞懸濁液に検体 1-100 μM を添加し、4-40°Cで1-30分インキュベーションする。次に、カルグラニュリンを添加し、しばらくして水可溶性カルシウム化合物を添加する。例えばカルグラニュリンを添加後、1-60分後、好ましくは3-10分後に水可溶性カルシウム化合物を添加する。この場合は、カルグラニュリンと水可溶性カルシウム化合物の添加量はそれぞれ 0.01-10 μM 、好ましくは 0.1-3 μM 程度用いられる。このカルグラニュリンと水可溶性カルグ

ラニュリン化合物との添加順序は、前記のようにまずカルグラニュリンを添加し、次いで水可溶性カルシウム化合物を添加してもよいし、あるいは水可溶性カルシウム化合物を添加し、カルグラニュリンを添加してもよい。しかし最も好ましい例は、まずカルグラニュリンと水可溶性カルシウム化合物とを反応させて活性型カルグラニュリンを調製し、これを前記細胞系に添加することが好ましい。検体は、前記したようにカルグラニュリン添加の前ばかりではなく、カルグラニュリンまたは活性型カルグラニュリン添加と同時にあるいはこれらのカルグラニュリン添加後に細胞系に添加してもよい。このようにして顆粒放出反応を開始させる。

また顆粒放出能を有する細胞系、例えば好中球または好中球様の培養細胞をマイクロインジェクションする場合は、適当な濃度の顆粒放出反応を阻害または活性化する物質を含有することが疑われる検体を、例えば $1\text{-}100 \mu\text{M}$ の濃度とし、好中球または好中球様の培養細胞に添加し、例えば $4\text{-}40^\circ\text{C}$ で $1\text{-}30$ 分間インキュベーションする。カルグラニュリンを適当な濃度、例えば $0.01\text{-}10 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\text{-}3 \mu\text{M}$ の濃度でマイクロインジェクションし、水可溶性カルシウム化合物を、例えば $0.01\text{-}10 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\text{-}3 \mu\text{M}$ の濃度で同時に、またはカルグラニュリンをマイクロインジェクション後、例えば $1\text{-}60$ 分後、好ましくは $3\text{-}10$ 分後に水可溶性カルシウム化合物をマイクロインジェクションすることにより顆粒放出反応を開始させる。

さらに、好中球または好中球様の培養細胞をリポソームと反応させる場合、適当な濃度の顆粒放出反応を阻害または活性化する物質を含有することが疑われる検体を例えば $1\text{-}100 \mu\text{M}$ の濃度とし、好中球懸濁液または好中球様の培養細胞懸濁液に添加し、例えば $1\text{-}30$ 分間インキュベーションする。カルグラニュリンをあらかじめ、例えば $0.01\text{-}10 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\text{-}3 \mu\text{M}$ の濃度の水可溶性カル

シウム化合物と混合し、例えば1-30分間、4-40°Cでインキュベーションした後、例えば 0.01-10 μM、好ましくは 0.1-3 μM の濃度でリポソームに封入し、これを、好中球懸濁液または好中球様の培養細胞懸濁液に添加することにより顆粒放出反応を開始させる。

カルグラニュリン遺伝子を導入しカルグラニュリンを強発現した細胞、例えばカルグラニュリン遺伝子を導入した好中球または好中球様の培養細胞を使用する場合は、適当な濃度の顆粒放出反応を阻害または活性化する物質を含有することが疑われる検体を例えば1-30分間インキュベーションする。水可溶性カルシウム化合物を、例えば 0.01-10 μM、好ましくは 0.1-3 μM の濃度で添加し、例えば1-30分間インキュベーションした後、カルグラニュリンイオノフォア、例えば A 23187 またはイオノマイシンを 0.01-10 μM、好ましくは 0.1-3 μM の濃度で添加することにより顆粒放出反応を開始させる。

次にC)の該細胞系から放出された検出対象物質を検出する工程を行なう。

好中球に含まれる顆粒としては、アズール顆粒（一次顆粒）、特殊顆粒（二次顆粒）および貯蔵顆粒（三次顆粒）が挙げられる。アズール顆粒からは酸性 β -グリセロフォスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、N-アセチル- β -グルクロサミニダーゼ、 α -マンノシダーゼ、アリールスルファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -フコシダーゼ、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンG、エラスターーゼ、プロテイナーゼ3、ミエロペルオキシダーゼ、およびリゾチームなどが放出される。特殊顆粒からはコラゲナーゼ、リゾチーム、ラクトフェリン、ビタミンB₁₂結合蛋白質およびシトクロムbなどが放出される。貯蔵顆粒からはグルチナーゼ、N-アセチル- β -グルクロサミニダーゼ、カテプシンB、カテプシンD、 β -グルクロニダーゼ、 β -グルセロフォスファターゼおよび α -マンノシダーゼなどが放出される。これらの物質は、検出対象物質として選択すること

ができる。これらの検出対象物質の量はそれぞれ適当な方法にて定量することができる。

例えば、アズール顆粒より放出されるミエロペルオキシダーゼ量は、3、3'、5、5'-テトラメチルベンジンおよび過酸化水素を基質とし、分光光度計にて650nmでの吸光度の増加率より定量することができる。特殊顆粒より放出されるラクトフェリンは、抗ラクトフェリン抗体を使用したELISA (enzyme-linked immunosassay、オキシス社製キット) により定量することができる。貯蔵顆粒より放出されるN-アセチル- β -グルクロサミニダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、および α -マンノシダーゼは、4-メチルウンベリフェリル誘導体(シグマ社製)を基質とし、加水分解され遊離した4-メチルウンベリフェリルを蛍光分光光度計にて励起波長365nm、蛍光波長450nmにて定量することができる。

本発明の顆粒放出反応を阻害または活性化することが疑われる物質を含有する検体の検出方法はこのようにして行なわれる。従って、前記検体中の顆粒放出反応を阻害または活性化する物質の活性値を定量的に検出することができる。

本発明の方法の定量方法を例示すると次のとおりである。

適当な濃度のスクリーニングの対象となる物質(検体)を高透過性細胞膜を有する好中球懸濁液または好中球様培養細胞懸濁液に存在させ、適当な濃度の水溶性カルシウム化合物と適当な濃度のカルグラニュリンを添加し顆粒放出量を測定する。例えば、ヒト好中球をジギトニンにて処理し高透過性膜を有するヒト好中球を 5×10^6 個/ml- 5×10^7 個/mlに調製し、検体を1-100 μMとなるように添加し、カルグラニュリンAを0.01-10 μM、好ましくは、0.1-3 μM、塩化カルシウム水溶液を0.01-10 μM、好ましくは0.1-3 μMとなるように添加し、25-40 °C、好ましくは30-70°Cで、1-60分間、好ましくは5-15分間インキュベーションする。また、このインキュベーションにおいて用いられる媒体としては、例え

ば 100mM-200mM の塩化カリウム、10mM-20mM の塩化ナトリウムおよび 0.3mM-3mM のEGTAを含むリン酸、MOPS、HEPES、Tris、TAPA、BESまたはTESなどの pH7-7.4 程度の緩衝液が挙げられる。さらにこのインキュベーションの間に放出された物質量を定量し、検体非添加のコントロールと比較する。

本発明によれば、好中球または好中球様の培養細胞に、カルグラニュリン活性を増加せしめ、ついで顆粒放出を増加せしめる方法のために使用する、カルグラニュリン活性活性化物質のスクリーニング法が提供される。適当な濃度のスクリーニングの対象となる物質（検体）、例えば 1-100 μ M の濃度を選択し、高透過性細胞膜を有する好中球懸濁液または好中球様の培養細胞懸濁液に存在させ、適当な濃度の水可溶性カルシウム、例えば 0.01-10 μ M 、好ましくは 0.1-3 μ M の濃度でカルグラニュリンを適当な濃度、例えばカルグラニュリンAを 0.01-10 μ M 、好ましくは 0.1-3 μ M で添加し、増加した顆粒放出量をさらに増加させる物質をスクリーニングする。

本発明の好中球または好中球様の培養細胞の細胞膜を透過でき得るカルグラニュリン活性活性化方法により、簡便なカルグラニュリン活性阻害物質のスクリーニング方法を提供する。すなわち、適当な濃度のスクリーニングの対象となる物質（検体）、例えば 1-100 μ M の濃度を選択し、好中球懸濁液または好中球様の培養細胞懸濁液に存在させ、適当な濃度のカルグラニュリン活性活性化剤、例えば 0.01-100 μ M 、好ましくは 0.1-10 μ M を添加し、顆粒放出を阻害する物質をスクリーニングする。

好中球の顆粒放出は前記のように血管内膜を障害する。血管内膜障害は、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、急性心筋梗塞時の虚血後再灌流障害、糸球体腎症、のう胞性線維症、リューマチ性関節炎、慢性気管支炎、脳血管レン縮、喘息、末梢循環障害、狭心症、高血圧症、動脈硬化に深く関与している。従って、上記好中球

顆粒放出阻害剤スクリーニング法は血管内膜障害抑制物質のスクリーニング法としても用いることができる。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例1のカルグラニュリンAによるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のエラスターゼ放出反応図である。

第2図は、実施例1のカルグラニュリンBによるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のエラスターゼ放出反応図である。

第3図は、実施例1のカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの混合物によるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のエラスターゼ放出反応図である。

第4図は、実施例2のカルグラニュリンAによるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のラクトフェリン放出反応図である。

第5図は、実施例2のカルグラニュリンBによるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のラクトフェリン放出反応図である。

第6図は、実施例2のカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの混合物によるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のラクトフェリン放出反応図である。

発明を実施するための最良の形態

次に、実施例を挙げて本発明を具体的に示す。しかし本発明はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

〔実施例1〕

カルグラニュリン含量の増減に基づいてヒト好中球のエラスターゼ放出をコントロールさせる方法

エラスターゼは好中球の1次顆粒内に存在する代表的な放出物質である。エラスターゼは蛋白質分解酵素であり、血管等に存在する弾性蛋白質エラスチンを分解し、障害を発生させる。ヒト好中球を使用し、エラスターゼ放出量をカルグラ

ニュリンにてコントロールする方法について説明する。

好中球浮遊液はヒト静脈より採血された血液より続生化学実験講座 8 血液・下、第 679-685 頁に記載された方法により調製した。好中球浮遊液を細胞濃度が 1×10^7 個/ml となるようにプラスチック製試験管内で Permeabilized Buffer(PB) (30mM HEPES、100mM KCl、20mM NaCl、1mM EGTA、pH7.0) に懸濁し、37°Cで10 分間インキュベーションした。ジギトニン(Sigma社製)を終濃度 5~7.5 μg/ml となるように好中球浮遊液に添加し、37°Cで15分間インキュベーションした。好中球浮遊液を 1200rpm で 5 分間遠心分離した。上清を捨てた後、沈殿物である好中球を PB 中に再浮遊させ高透過性好中球浮遊液(細胞濃度； 1×10^7 個/ml)を調製した。

96穴イムノプレートの各ウエルに、高透過性好中球浮遊液 200 μl ずつ分注し、37°Cで15分間インキュベーションした。次いで、塩化カルシウム水溶液(終濃度 1 μM)と、カルグラニュリンA、カルグラニュリンB、又はそれらを等モル比で混合した混合物の各カルグラニュリンを終濃度 0 μM、0.3 μM、1 μM または 3 μM として添加し、37°Cで 5 分間インキュベーションした。

該96穴イムノプレートを 4 °C、1200rpm で 1分間遠心分離し(イムノプレート用遠心分離器)、上清を別の96穴イムノプレートに 160 μl ずつ分注し、37°Cで 5 分間インキュベーションした。その96穴イムノプレートに、エラスターーゼ基質 10mM (Suc-Ala-Pro-Ala-pNA、ペプチド研社製) を添加し軽く振とうした後、37 °Cで30分間インキュベーションし、405 nm の吸収強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

測定結果を第1図(カルグラニュリンAの場合)、第2図(カルグラニュリンBの場合)および第3図(カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの混合物の場合)に示す。カルグラニュリンAはその添加量を増加せしめてカルグラニ

ュリン活性を増加させることにより、好中球のエラスターゼ放出量を増加させた（第1図）。カルグラニュリンA非存在下のエラスターゼ放出量を1とした時、 $3 \mu\text{M}$ のカルグラニュリンAはエラスターゼ放出量を約8倍と顕著に増加させた。カルグラニュリンBはその添加量を増加せしめてカルグラニュリン活性を増加させることにより、好中球のエラスターゼ放出量を増加させた（第2図）。カルグラニュリンB非存在下のエラスターゼ放出量を1とした時、 $3 \mu\text{M}$ のカルグラニュリンBはエラスターゼ放出量を約7倍と顕著に増加させた。カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの混合物はその添加量を増加せしめてカルグラニュリン活性を増加させることにより、好中球のエラスターゼ放出量を増加させた（第3図）。混合物非存在下のエラスターゼ放出量を1とした時、 $3 \mu\text{M}$ のカルグラニュリンAとカルグラニュリンBの混合物はエラスターゼ放出量を約6倍と顕著に増加させた。

この結果は、好中球内のカルグラニュリンA、カルグラニュリンBまたはカルグラニュリンAとカルグラニュリンBの混合物の添加量を変化させることでエラスターゼの放出量を顕著に変化できることを示す。

〔実施例2〕

カルグラニュリン含量の増減に基づいてヒト好中球のラクトフェリン放出をコントロールさせる方法

ラクトフェリンは好中球の2次顆粒内に存在する代表的な物質である。ヒト好中球を使用し、ラクトフェリン放出量をカルグラニュリンにてコントロールする方法について説明する。

好中球浮遊液はヒト静脈より採血された血液より続生化学実験講座8 血液・下、第679-685頁に記載された方法により調製した。細胞濃度が 1×10^7 個/ ml となるように好中球浮遊液をプラスチック製試験管内でPBに懸濁し、37°Cで10分間

インキュベーションした。ジギトニン(Sigma社製)を終濃度 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるよう
に好中球浮遊液に添加し、 37°C で15分間インキュベーションした。

好中球浮遊液を 1200rpm で5分間遠心分離した。上清を捨てた後、沈殿物である好中球をP B中に再浮遊し高透過性好中球浮遊液(細胞濃度： 1×10^7 個/ml)を調製した。96穴イムノプレートの各ウェルに、高透過性好中球浮遊液 $200\mu\text{l}$ ずつ分注し、 37°C で15分間インキュベーションした。次いで、塩化カルシウム水溶液(終濃度 $1\text{ }\mu\text{M}$)と、カルグラニュリンA、カルグラニュリンB、及びそれらを等モル比で混合した混合物の各カルグラニュリンを終濃度 $0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.3\text{ }\mu\text{M}$ 、 $1\text{ }\mu\text{M}$ または $3\text{ }\mu\text{M}$ として添加し、 37°C で5分間インキュベーションした。96穴イムノプレートを 4°C 、 1200rpm 、1分間遠心分離し(イムノプレート用遠心分離器)、上清を得た。ラクトフェリンの定量は、ELISA-kit(OXIS社)を用いた。

その結果を第4図、第5図および第6図に示した。カルグラニュリンAはその添加量を増加せしめてカルグラニュリン活性を増加させることにより、好中球のラクトフェリン放出量を増加させた(第4図)。カルグラニュリンA非存在下のラクトフェリン放出量を1とした時、 $3\text{ }\mu\text{M}$ のカルグラニュリンAはラクトフェリン放出量を約6倍と顕著に増加させた。カルグラニュリンBはその添加量を増加せしめてカルグラニュリン活性を増加させることにより、好中球のラクトフェリン放出量を増加させた(第5図)。カルグラニュリンB非存在下のラクトフェリン放出量を1とした時、 $3\text{ }\mu\text{M}$ のカルグラニュリンBはラクトフェリン放出量を約5倍と顕著に増加させた。カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの混合物はその添加量を増加せしめてカルグラニュリン活性を増加させることにより、好中球のラクトフェリン放出量を増加させた(第6図)。混合物非存在下のエラスターーゼ放出量を1とした時、 $3\text{ }\mu\text{M}$ のカルグラニュリンAとカルグラニュリンBの混合物はエラスターーゼ放出量を約5倍と顕著に増加させた。

この結果は、好中球内のカルグラニュリンA、カルグラニュリンBもしくはカルグラニュリンAとカルグラニュリンBの混合物量を変化させることでラクトフェリンの放出量を顕著に変化できることを示す。

実施例1および2の結果より、カルグラニュリンが好中球の顆粒放出をコントロールする重要な蛋白質であることが示される。

[実施例3]

スクリーニングの対象となる物質（検体）を、カルグラニュリン活性を変化させ好中球からのエラスター放出反応量を顕著に増加させた系に存在させ、顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する物質のスクリーニング法。

ヒト静脈より採血された血液より続生化学実験講座8 血液・下、第 679-685頁に記載された方法により好中球浮遊液を調製した。細胞濃度が 1×10^7 個/ml となるように好中球浮遊液をプラスチック製試験管内でPB中に懸濁し好中球懸濁液（細胞濃度； 1×10^7 個/ml）を調製し、37°Cで10分間インキュベーションした。ジギトニンを終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように好中球懸濁液に添加し、37°Cで15分間インキュベーションした。好中球懸濁液を1200rpm で5分間遠心分離した。

上清を捨てた後、好中球をPB中に再懸濁し高透過性好中球懸濁液（細胞濃度； 1×10^7 個/ml）を調製した。96穴イムノプレートの各ウエルに、高透過性好中球浮遊液を $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し、37°Cで15分間インキュベーションした。スクリーニングの対象となる検体として、N-(4-メトキシベンジル)-N-(4-メトキシフェニル)-7-ピペラジニルヘプチルアミン3塩酸塩（化合物1）、N-ベンジル-N-(4-メトキシフェニル)-7-ピペラジニルヘプチルアミン3塩酸塩（化合物2）、1,1-（ジ-4-ヒドロキシフェニル）-2-エチル-1-オクタエン（化合物3）、2-ヒドロキシ-5-(((4-((2-ピリジニルアミノ)スルホニル)フェニル)アゾ)安息香酸（化合物4）を用いた。

これらの検体をそれぞれ、終濃度30 μM となるように添加し、37°Cで15分間インキュベーションした。次いで、塩化カルシウム水溶液（終濃度1 μM）と、カルグラニュリンA、カルグラニュリンB、又はそれらを等モル比で混合した混合物の各カルグラニュリンを終濃度0 μM、0.3 μM、1 μM または3 μM として添加し、37°Cで5分間インキュベーションした。96穴イムノプレートを4°C下、1200rpm で1分間遠心分離し（イムノプレート用遠心分離器）、上清を別の96穴イムノプレートに分注し、37°Cで5分間インキュベーションした。エラスター基質10mM(Suc-Ala-Pro-Ala-pNA) を96穴イムノプレートに添加し軽く振とうした後、37°Cで30分間インキュベーションし、405nm の吸収強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

測定結果を第1表に示した。スクリーニングの対象となる検体を含まないコントロールの放出量を100%とし、それと比較することによりスクリーニングの対象となる検体化合物の放出阻害率を求めた。化合物1および化合物2は、カルグラニュリンAの活性を増加させて、好中球からのエラスター放出反応量を顕著に増加させた系において、顕著に放出量を抑制した。化合物3は上記系において顕著に放出量を増加させた。

第 1 表

検体化合物名	放出量 (%)
コントロール	100
化合物1	61
化合物2	51
化合物3	151
化合物4	75

産業上の利用可能性

本発明は、好中球の顆粒放出をコントロールする方法としてきわめて有用である。またそれに基づいた顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する物質の検出方法スクリーニング法あるいは検出定量方法は好中球の顆粒放出により惹起される血管内膜障害に基づく各種病態の治療薬を提供する上できわめて有用である。

請求の範囲

1. 顆粒放出能を有する細胞系に、活性型カルグラニュリンを増加または減少せしめる処理をなすことにより、該細胞系の顆粒放出を増加または減少せしめることを特徴とする顆粒放出のコントロール方法。
2. 顆粒放出能を有する細胞系が、温血動物由来の好中球または好中球様の培養細胞である請求の範囲1記載の方法。
3. 活性型カルグラニュリンが、
 - (i) 配列表配列番号1の1-93のアミノ酸配列からなり、且つカルシウムが結合しているペプチド、
 - (ii) 配列表配列番号2の1-114のアミノ酸配列からなり、且つカルシウムが結合しているペプチド、
 - (iii) 配列表配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が置換、欠損または付加されたアミノ酸配列からなり、且つカルシウムが結合しており、顆粒放出能を有する細胞系の顆粒放出を増加せしめる活性を有するペプチド、のいずれかに1種以上である請求の範囲1又は2に記載の方法。
4. 次の工程を含むことを特徴とする、顆粒放出反応を阻害または活性化する物質の検出方法。
 - A) 顆粒放出能を有する細胞系の活性型カルグラニュリンを増加せしめる工程；
 - B) 顆粒放出反応を阻害または活性化する物質を含有することが疑われる検体と顆粒放出能を有する細胞系とを前記工程A)の前または後あるいは工程A)中に接触せしめ、インキュベーションする工程；
 - C) 該細胞系から放出された検出対象物質を検出する工程。
5. 工程A)の顆粒放出能を有する細胞系の活性型カルグラニュリンを増加せしめ

る工程が、

- a) 顆粒放出能を有する細胞系を、高透過性細胞となし、
- b) 細胞系に、カルグラニュリンおよび水可溶性カルシウム化合物を同時又は順次添加し、該細胞系をインキュベーションする工程を順次行なうことを特徴とする請求の範囲4記載の方法。

6. 顆粒放出能を有する細胞系が、温血動物由来の好中球または好中球様の培養細胞である請求の範囲4又は5に記載の方法。

7. 該活性型カルグラニュリンが、

- (i) 配列表配列番号1の1-93のアミノ酸配列からなり、且つカルシウムが結合しているペプチド、
- (ii) 配列表配列番号2の1-114のアミノ酸配列からなり、且つカルシウムが結合しているペプチド、
- (iii) 配列表配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が置換、欠損または付加されたアミノ酸配列からなり、且つカルシウムが結合している顆粒放出能を有する細胞系の顆粒放出を増加せしめる活性を有するペプチド、

のいずれか1種以上である請求の範囲4～6のいずれかに記載の方法。

8. 水可溶性カルシウム化合物が、水と接触したときに、カルシウムイオンが100 mM以上となり得る溶液または粉末である請求の範囲5記載の方法。

9. 検出方法が検出定量法である請求の範囲4～8のいずれかに記載の方法。

10. 検出方法がスクリーニング方法である請求の範囲4～8のいずれかに記載の方法。

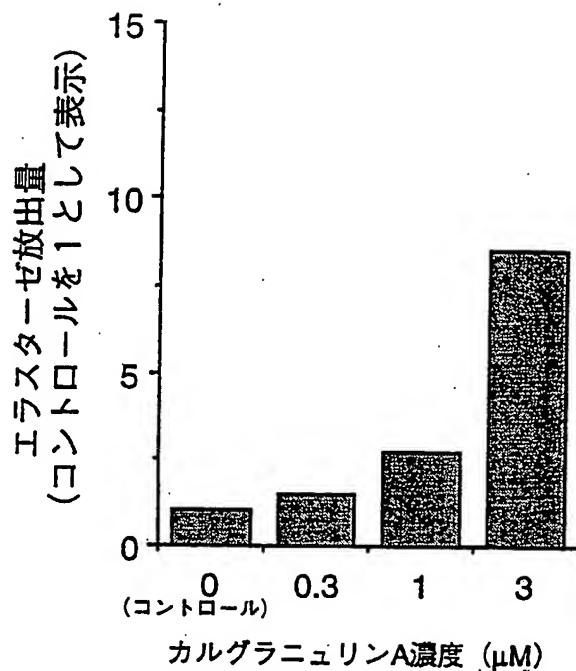
11. 請求の範囲10に記載の方法によって顆粒放出反応を阻害する物質をスクリーニングして、血管内膜障害抑制物質を取得することを特徴とする血管内膜障害

3 1

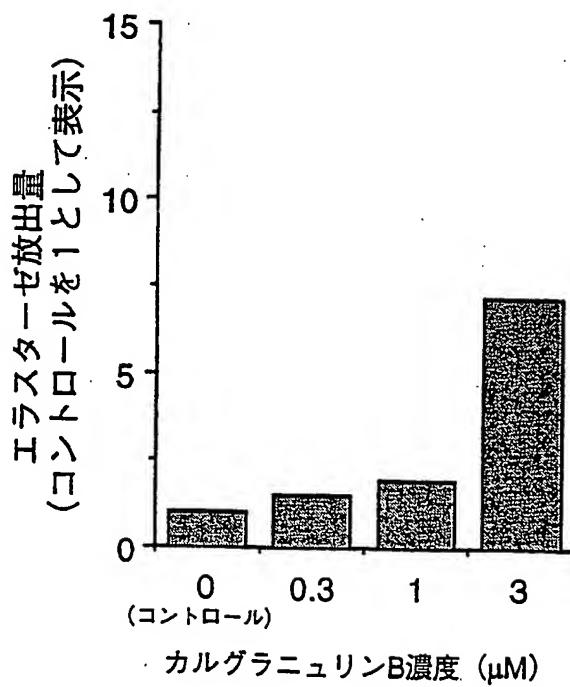
抑制物質の取得方法。

1/3

第1図

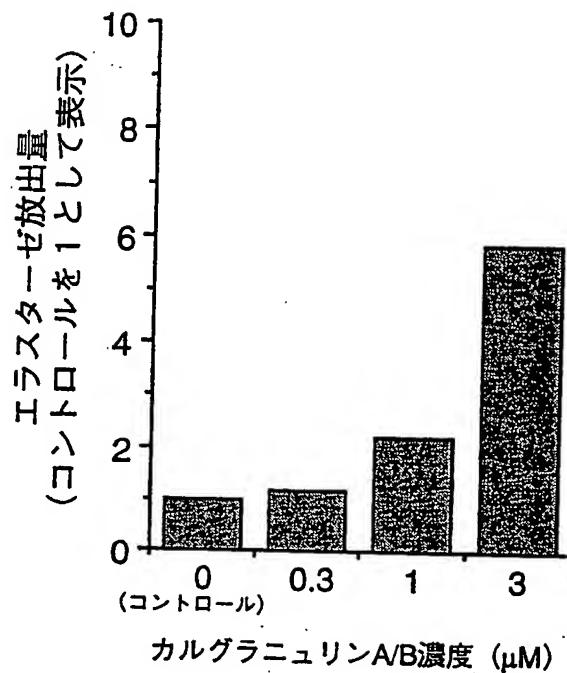


第2図

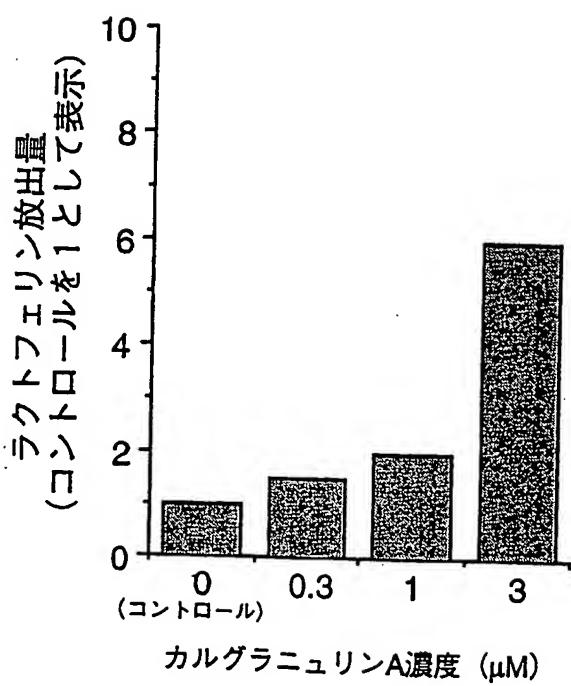


2/3

第3図

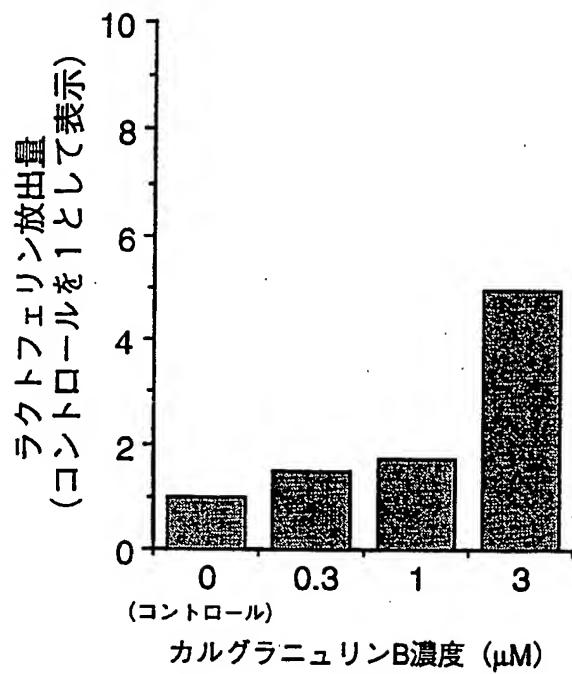


第4図

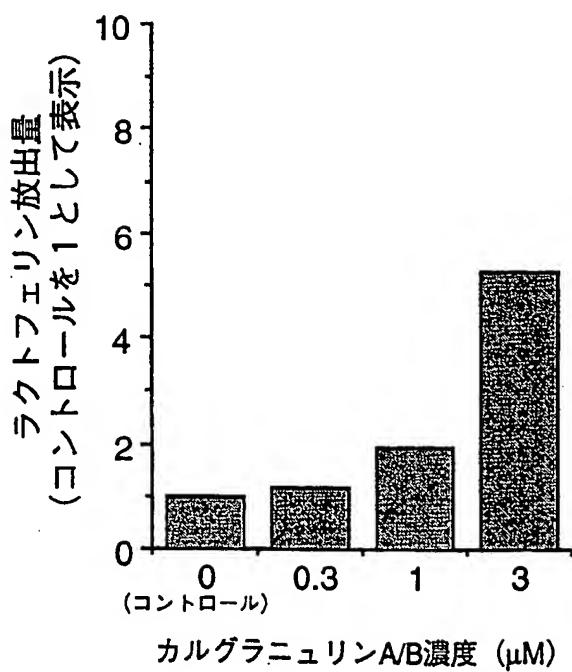


3/3

第5図



第6図



配列表

< 110 > 旭化成工業株式会社

< 120 > 顆粒放出のコントロール方法

-

< 130 > ASAHI-3

< 150 > JP10-274574

< 151 > 1998-9-29

< 160 > 2

< 210 > 1

< 211 > 282

< 212 > DNA

< 213 > ヒト(human)

< 300 >

< 301 > Karel Odink et al.

< 302 > Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages
of rheumatoid arthritis

< 303 > Nature

< 304 > 330

< 305 > 5

< 306 > 80-82

< 307 > November 1987

< 400 > 1

atg ttg acc gag ctg gag aaa gcc ttg aac tct atc atc gac gtc tac 48

Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr

1

5

10

15

cac aag tac tcc ctg ata aag ggg aat ttc cat gcc gtc tac agg gat 96

His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp

20

25

30

gac ctg aag aaa ttg cta gag acc gag tgt cct cag tat atc agg aaa 144

Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys

35

40

45

aag ggt gca gac gtc tgg ttc aaa gag ttg gat atc aac act gat ggt 192

Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly

50

55

60

gca gtt aac ttc cag gag ttc ctc att ctg gtg ata aag atg ggc gtg 240

Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val

65

70

75

80

gca gcc cac aaa aaa agc cat gaa gaa agc cac aaa gag tag 282

Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu

85

90

< 210 > 2

< 211 > 345

< 212 > DNA

< 213 > ヒト (human)

< 300 >

< 301 > Karel Odink et al.

< 302 > Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages
of rheumatoid arthritis

< 303 > Nature

< 304 > 330

< 305 > 5

< 306 > 80-82

< 307 > November 1987

< 400 > 2

atg	act	tgc	aaa	a ^t g	tcg	cag	ctg	gaa	cgc	aac	ata	gag	acc	atc	atc	48
Met	Thr	Cys	Lys	Met	Ser	Gln	Leu	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Thr	Ile	Ile	
1				5							10				15	
aac	acc	ttc	cac	caa	tac	tct	gtg	aag	ctg	ggg	cac	cca	gac	acc	ctg	96
Asn	Thr	Phe	His	Gln	Tyr	Ser	Val	Lys	Leu	Gly	His	Pro	Asp	Thr	Leu	
							20				25				30	

aac	cag	ggg	gaa	t ^t c	aaa	gag	ctg	gtg	cga	aaa	gat	ctg	caa	aat	ttt	144
Asn	Gln	Gly	Glu	Phe	Lys	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Asp	Leu	Gln	Asn	Phe	
35					40						45					

-	ctc	aag	aag	gag	aat	aag	aat	gaa	aag	gtc	ata	gaa	cac	atc	atg	gag	192
Leu	Lys	Glu	Asn	Lys	Asn	Glu	Lys	Val	Ile	Glu	His	Ile	Met	Glu			
50					55				60								

gac	ctg	gac	aca	aat	gca	gac	aag	cag	ctg	agc	ttc	gag	gag	ttc	atc	240
Asp	Leu	Asp	Thr	Asn	Ala	Asp	Lys	Gln	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Phe	Ile	
65					70				75					80		

atg	ctg	atg	g ^c g	agg	cta	acc	tgg	gcc	tcc	cac	gag	aag	atg	cac	gag	288
Met	Leu	Met	Ala	Arg	Leu	Thr	Trp	Ala	Ser	His	Glu	Lys	Met	His	Glu	
					85				90			95				

ggt	gac	gag	ggc	cct	ggc	cac	cac	cat	aag	cca	ggc	ctc	ggg	gag	ggc	336
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His Lys Pro Gly Leu Gly Glu Gly

100

105

110

acc ccc taa

345

Thr Pro

:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12Q3/00, C07K14/47, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12Q3/00, C07K14/47, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq, JICST(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	Claus, K. et al., "Novel insights into structure and function of MRP8(S100A8) and MRP14(S100A9)", Biochim. Biophys. Acta (1998, Dec.), Vol. 1448, No. 2, pages 200-211	1-11
A	F. Burwinkel et al., "Ultrastructural localization of the S-100-like proteins MRP8 and MRP14 in monocytes is calcium-dependent" Histochemistry, Vol. 101, No. 2, Pages 113-120	1-11
A	Karel, O. et al., "Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis", Nature (1987), Vol. 330, pages 80-82	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 December, 1999 (09.12.99)	Date of mailing of the international search report 21 December, 1999 (21.12.99)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/05302

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl⁶ C12Q3/00, C07K14/47, C12Q1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl⁶ C12Q3/00, C07K14/47, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
Genbank/DDBJ/EMBL/Genesea, JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	Claus, K. et al. "Novel insights into structure and function of MRP8(S100A8) and MRP14(S100A9)" Biochim. Biophys. Acta (1998, Dec.) 第1448巻 第2号 p. 200-211	1-11
A	F. Burwinkel et al. "Ultrastructural localization of the S-100-like proteins MRP8 and MRP14 in monocytes is calcium-dependent" Histochemistry (1994) 第101巻 第2号 p. 113-120	1-11
A	Karel, O. et al. "Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis" Nature (1987) 第330巻 p. 80-82	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.12.99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

引地 進

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488